

TESIS DE MÁSTER

Puesta a punto de un método de análisis de
virulencia de *Staphylococcus aureus* en
Caenorhabditis elegans

Gaizka Trueba Ambelez

Curso 2011-2012

Directora: Dra. Cristina Solano Goñi



Índice

1. Resumen	2
2. Summary	3
3. Introducción	4
3.1.- Biofilms bacterianos	4
3.2.- <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3.2.1.- Generalidades	6
3.2.2.- Proceso de formación de biofilm por <i>S. aureus</i>	7
3.3.- Modelos animales para el estudio de la patogénesis de <i>S. aureus</i>	9
3.3.1.- Modelo en mamífero: <i>Mus musculus</i>	9
3.3.2.- Modelo no mamífero: <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
4. Material y métodos	13
4.1.- Cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados	13
4.2.- Mantenimiento de <i>C. elegans</i> y análisis visual de su desarrollo	14
4.3.- Ensayo de supervivencia de <i>C. elegans</i> frente a una infección por <i>S. aureus</i>	15
5. Objetivos	17
6. Resultados y discusión	18
6.1.- Puesta a punto del mantenimiento y desarrollo de <i>C. elegans</i>	18
6.2.- Ensayos de infección de <i>C. elegans</i> con cepas de <i>S. aureus</i> que poseen diferente capacidad de formar biofilm y virulencia	20
6.2.1.- Infección de <i>C. elegans</i> con las cepas <i>S. aureus</i> 132 y 15981	21
6.2.2.- Comparación de la virulencia de la cepa <i>S. aureus</i> 132 y la del aislado clínico <i>S. aureus</i> MW2	25
6.2.3.- Análisis de la virulencia de un mutante en <i>rot</i>	26
7. Conclusiones	28
8. Bibliografía	29

1. Resumen

La forma clásica para analizar la virulencia de los microorganismos patógenos humanos ha sido el empleo de modelos animales mamíferos. Desde hace algún tiempo, se han desarrollado modelos alternativos no mamíferos, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que presenta una capacidad natural de alimentarse de bacterias. Además, existen herramientas genéticas y moleculares para analizar interacciones huésped-patógeno, es fácilmente cultivable, tiene un ciclo de vida corto y es un modelo económico.

Existen estudios previos que muestran a *C. elegans* como un modelo adecuado para el estudio de la virulencia de *S. aureus*. Así, el objetivo de este trabajo fin de máster ha sido la puesta a punto de este modelo de infección en el laboratorio y su uso para la diferenciación de la virulencia de cepas que presentan diferentes grados en su capacidad de formar biofilms.

Para ello, en primer lugar se determinaron las condiciones óptimas de cultivo del nematodo y las características morfológicas de cada estadio de desarrollo. En segundo lugar, se implementó el modelo de infección, comparando la virulencia de tres cepas de *S. aureus* con diferente capacidad de formar biofilm y diferente grado de virulencia en ratón. Los resultados obtenidos mostraron un grado de infección similar de las tres cepas y menor al esperado. Por último, se analizó la virulencia de una cepa mutante en un represor de la expresión de toxinas, obteniéndose de nuevo un grado de infección similar al obtenido con las cepas anteriores. En base a estos resultados se concluyó que el uso de este modelo, en las condiciones utilizadas, no es adecuado para analizar la virulencia de *S. aureus*.

2. Summary

The classical way to analyze the virulence of human bacterial pathogens has been the use of mammalian animal models. Over the past few years, non-mammalian alternative models have been developed, such as the nematode *Caenorhabditis elegans*, which has a natural ability to feed on bacteria. In addition, there exist genetic and molecular tools to analyze host-pathogen interactions, the nematode is easily cultivated, it has a short life cycle and is an economically viable model.

Previous studies have shown *C. elegans* as an adequate model for studying the virulence of *S. aureus*. Thus, the objective of this Master Thesis has been the setting-up of this model of infection in the laboratory and its use for the differentiation of the virulence of strains with different degrees in their ability to form biofilms.

To do this, we first determined the optimal culture conditions of the nematode and the morphological characteristics at each stage of its development. Secondly, an infection model was implemented, and the virulence of three strains of *S. aureus* with different abilities to form a biofilm and different degrees of virulence in mice was compared. The results showed a similar degree of infection, which was lower than expected, when any of the strains was used. Finally, we examined the virulence of a mutant strain in a repressor of the expression of toxins, and it again led to a degree of infection similar to that shown by the other strains. Based on these results, it was concluded that the use of this model, under the conditions tested, is not suitable for analyzing the virulence of *S. aureus*.

3. Introducción

3.1.- Biofilms bacterianos

Muchas bacterias comensales y patógenas son capaces de vivir tanto en diferentes ambientes como en el huésped, y por lo tanto deben ser capaces de adaptarse a cambios bruscos en la disponibilidad de nutrientes así como a los sistemas de defensa primarios y secundarios. La piedra angular de esta supervivencia radica en la adaptación genética de las bacterias, la cual es resultado de mutaciones y recombinaciones genéticas, adquisición de nuevo material genético o regulación de la expresión génica (Jefferson, 2004).

Un ejemplo de gran importancia y relevancia clínica de adaptación bacteriana es la capacidad de crecer formando un biofilm, siendo éste definido como una comunidad multicelular de bacterias embebida en una matriz extracelular que ellas mismas producen y adherida a superficies inertes o a tejidos vivos (Christensen *et al.*, 1987, Costerton *et al.*, 1999, Cucarella *et al.*, 2001, Gristina *et al.*, 1989). Los estudios llevados a cabo en los últimos años sobre los biofilms permiten afirmar que éstos representan la forma de vida predominante de las bacterias, constituyen una estrategia común de supervivencia del mundo microbiano y por lo tanto son ubicuos en nuestro planeta (Romero & Kolter, 2011).

La matriz extracelular del biofilm está formada por sustancias poliméricas extracelulares que comprenden proteínas, carbohidratos, DNA y vesículas de membrana (Flemming & Wingender, 2010, Flemming *et al.*, 2007). Esta matriz forma el andamio necesario para dar lugar a la estructura tridimensional del biofilm y es la responsable de la cohesión celular dentro del biofilm y la adhesión a superficies (Flemming & Wingender, 2010). Es importante destacar el hecho de que la secreción de la matriz extracelular y la consecuente formación del biofilm permite a las bacterias sésiles tener características fenotípicas y fisiológicas diferentes de las bacterias planctónicas. Así, esta forma de crecimiento, confiere a las bacterias una serie de ventajas, entre las que se encuentran una mayor resistencia frente a fuerzas físicas, radicales de oxígeno, cambios de pH, desinfectantes y antibióticos, el sistema inmune y el ayuno de nutrientes, (Baltimore & Mitchell, 1980, Kharazmi *et al.*, 1999, Jefferson, 2004).

Muchos biofilms formados en la naturaleza son polimicrobianos, es decir, están formados por diferentes especies bacterianas o incluso pueden llegar a contener mezclas

de bacterias y hongos. Se ha descrito que los miembros de este tipo de biofilms pueden especializarse y llevar a cabo diferentes funciones metabólicas dentro del biofilm (Shapiro, 1998, Loo *et al.*, 2003, Peleg *et al.*, 2010). Por otra parte, las bacterias que forman parte de biofilms mono-especie también muestran una heterogeneidad con respecto a su metabolismo, expresión génica y fisiología, llegándose a especular con la posibilidad de que puedan adoptar diferentes funciones biológicas dentro del biofilm (Webb *et al.*, 2003).

Actualmente, el estudio de los biofilms tiene un enorme interés científico y tecnológico, ya que, como consecuencia de sus características, constituyen un serio problema en sanidad humana, sanidad animal, instalaciones industriales y la industria alimentaria. Con respecto a la sanidad humana, se estima que un 65-80% de todas las infecciones están relacionadas con la formación de biofilms. Entre estas infecciones se encuentran la endocarditis, osteomielitis, caries dental, otitis media o la fibrosis quística (Donlan & Costerton, 2002). La tolerancia a los agentes antimicrobianos, que puede llegar a ser de 10 a 1000 veces mayor que la de bacterias planctónicas equivalentes, junto a la extraordinaria resistencia a la fagocitosis, hace que los biofilms sean extremadamente difíciles de erradicar, dando lugar a infecciones de tipo crónico (Lewis, 2001). Además, en muchos casos, los biofilms son responsables de la contaminación de material quirúrgico e implantes médicos como prótesis, válvulas cardíacas o catéteres urinarios e intravenosos. Este tipo de infecciones generalmente se remedian con la eliminación del dispositivo médico contaminado, con el consiguiente riesgo para la salud del paciente y el elevado coste económico que supone.

Después de más de una década de estudios genéticos relacionados con la formación del biofilm se han identificado una gran variedad de mutaciones que afectan a este proceso, en diferentes estadios de su ciclo de formación. Así, el ciclo se ha dividido en tres etapas, la primera de las cuales consiste en la adhesión a una superficie. En segundo lugar, se activa la producción de la matriz extracelular y la formación de una estructura tridimensional y por último, algunas células se liberan desde el biofilm para poder colonizar nuevas superficies y nichos. Gracias a este conocimiento, se han ido desarrollando diferentes estrategias para combatir el biofilm que están basadas en : (1) la inhibición de la adhesión y colonización microbiana de una superficie; (2) la interferencia con las moléculas que intervienen en el desarrollo del biofilm; (3) la disgregación de la matriz extracelular y (4) el desarrollo de antimicrobianos que

consigan eliminar a las bacterias que forman parte de un biofilm (Francolini & Donelli, 2010).

3.2.- *Staphylococcus aureus*

3.2.1.- Generalidades

S. aureus es un coco Gram positivo, ubicuo y un patógeno oportunista de humanos y animales. Su alta versatilidad le permite adaptarse a entornos muy diferentes. Se halla de forma natural en las axilas, las ingles, la piel, el tracto intestinal y en las membranas mucosas (20% adultos son portadores nasales y un 30% son colonizados de forma intermitente (Wertheim *et al.*, 2005)) de forma asintomática. Estas localizaciones pueden servirle como reservorio a partir del cual atravesar la barrera epitelial, a través de lesiones en el epitelio o a causa de una cirugía, colonizando así tejidos internos (Gordon & Lowy, 2008).

Las infecciones estafilocócicas son la principal causa de infecciones nosocomiales en todo el mundo, contabilizándose más de un millón al año que afectan especialmente a pacientes inmunocomprometidos e inmunodeprimidos (Wu *et al.*, 2003, Yarwood *et al.*, 2004). Dentro de las especies estafilocócicas destaca *S. aureus* debido a la existencia de aislados meticilina resistentes que suponen un serio problema de salud pública (Bancroft, 2007, Klevens *et al.*, 2007).

La patogenicidad de *S. aureus* depende de la acción combinada de sus múltiples factores de virulencia. Éstos pueden ser componentes de su estructura y factores secretados tales como toxinas y enzimas que le proporcionan a la bacteria la capacidad de unirse al tejido del huésped, de destruir tejidos y de evadir el sistema inmune (Lopez Furst, 2011).

Los componentes asociados a la estructura de *S. aureus* involucrados en su patogenicidad son, entre otros, la cápsula, el péptidoglicano y la proteína A. La cápsula inhibe la fagocitosis y la quimiotaxis. El péptidoglicano estimula la proliferación de pirógenos endógenos, además de inhibir también la fagocitosis. La proteína A es capaz de unirse a la región Fc de la IgGs, inhibiendo así la opsonofagocitosis (Foster, 2005), es un quimioatrayente leucocitario y posee función anticomplemento (Tu *et al.*, 1999). En cuanto a las toxinas, *S. aureus* puede secretar citotoxinas que son tóxicas para leucocitos, eritrocitos macrófagos y plaquetas. Además puede producir proteasas que

rompen enlaces peptídicos en los extremos carboxi-terminal de ciertos aminoácidos (Gordon & Lowy, 2008, Drapeau *et al.*, 1972) y enterotoxinas que estimulan la liberación de mediadores inflamatorios, aumentan el peristaltismo intestinal, la pérdida de líquidos y la aparición de náuseas (Argudin *et al.*, 2010). Por último, *S. aureus* produce la enzima coagulasa que convierte el fibrinógeno en fibrina formando abscesos, la enzima catalasa que cataliza la conversión de peróxido en hidrógeno, permitiendo la supervivencia en el fagosoma, y la enzima lipasa (Gordon & Lowy, 2008) que promueve la hidrólisis de lípidos permitiendo la fagocitosis, diseminación y colonización de tejidos cutáneos y subcutáneos (Gordon & Lowy, 2008).

Con respecto a la patogénesis, cabe destacar que *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* son la causa más importante de infecciones asociadas a dispositivos médicos, tales como catéteres, dispositivos cardiovasculares o prótesis (O'Gara & Humphreys, 2001, Zimmerli *et al.*, 2004), debido a que poseen una gran capacidad para adherirse de forma irreversible a la superficie de estos materiales formando biofilms (Gotz, 2002).

3.2.2.- Proceso de formación de biofilm por *S. aureus*

La formación de biofilm por *S. aureus* puede darse por dos vías, la ica-dependiente y la ica-independiente.

La vía ica-dependiente es aquella en la que el biofilm requiere la síntesis del polisacárido denominado “polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) o “poly-N-acetylglucosamine” (PNAG), formado por monómeros de N-acetilglucosamina unidos por enlaces $\beta(1-6)$ (Cramton *et al.*, 1999, Heilmann *et al.*, 1996, McKenney *et al.*, 1999). Las proteínas necesarias para la síntesis de este exopolisacárido están codificadas por el operon *icaADBC* (Maira-Litran *et al.*, 2002), cuya expresión está reprimida por el regulador transcripcional IcaR (Jefferson *et al.*, 2004). La enzima IcaA posee actividad N-acetil-glucosaminiltransferasa y requiere el producto del gen *icaD* para su actividad óptima. El gen *icaC* codifica una proteína de membrana que alarga las cadenas oligoméricas que se han sintetizado y permite su translocación a la superficie de la bacteria. El gen *icaB* codifica una proteína anclada a la superficie implicada en la deacetilación del exopolisacárido. La mayoría de las cepas clínicas de *S. aureus* aisladas contiene el operón *ica* pero la expresión de este operón es muy variable y está estrictamente regulada (Arciola *et al.*, 2001, Cramton *et al.*, 1999, Fitzpatrick *et al.*, 2005, Fowler *et al.*, 2001, Frank *et al.*, 2004, Rohde *et al.*, 2004).

Durante mucho tiempo se ha considerado que el PIA/PNAG era el elemento esencial básico de la matriz del biofilm. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la formación de biofilm no requiere la presencia del exopolisacárido PIA/PNAG ya que varias proteínas son capaces de inducir la formación de biofilm en su ausencia (Beenken *et al.*, 2004, Cucarella *et al.*, 2001, Fitzpatrick *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2004, Merino *et al.*, 2009, O'Neill *et al.*, 2008, Shanks *et al.*, 2005, Shanks *et al.*, 2008, Sinha *et al.*, 1999). Proteínas con esta capacidad son Bap, SasG, proteína A y FnBPs (proteínas de unión a fibronectina). Todas estas proteínas no están siempre presentes en el biofilm por lo que *S. aureus* debe disponer de mecanismos de regulación de la síntesis de estos componentes para adecuar la composición del biofilm a las condiciones adecuadas.

La proteína de superficie Bap consta de 2276 aminoácidos, una región central formada por repeticiones y se ha identificado en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis de rumiantes. Las cepas de *S. aureus* Bap positivas son capaces de formar biofilms en ausencia de PIA/PNAG (Cucarella *et al.*, 2001, Cucarella *et al.*, 2004), son más resistentes a antibióticos (Cucarella *et al.*, 2004) y producen infecciones más persistentes que sus respectivos mutantes, en un modelo de infección de mastitis. La proteína SasG presenta homología en la secuencia con la proteína Pls (plasmin sensitive), que se encuentra en el elemento móvil *SCCmec* (Staphylococcal cassette chromosome mec) de algunas cepas MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) de *S. aureus* y la proteína Aap (Accumulation associated protein) de *S. epidermidis*. Se ha descrito que estas proteínas promueven la adherencia bacteriana a células del epitelio nasal humano, favoreciendo la adherencia a un mismo receptor no identificado en la superficie celular (Roche *et al.*, 2003). En referencia a SasG se ha descrito que su sobreexpresión desde un plásmido multicopia promueve la formación de biofilm *in vitro* (Kuroda *et al.*, 2008). En cuanto a la proteína A, su sobreexpresión induce la formación de biofilm y no necesita unirse covalentemente a la pared celular para promover este comportamiento multicelular (Merino *et al.*, 2009). Estudios recientes han descrito algunas cepas de *S. aureus* en las que la formación del biofilm está mediada por las proteínas de unión a fibronectina (FnBPA, FnBPB) (O'Neill *et al.*, 2008, Shanks *et al.*, 2008) y han demostrado que estas proteínas son capaces de inducir la producción del biofilm en ausencia del exopolisacárido PIA/PNAG (Vergara-Irigaray *et al.*, 2009).

3.3.- Modelos animales para el estudio de la patogénesis de *S. aureus*

3.3.1.- Modelo en mamífero: *Mus musculus*

El primer uso del ratón como animal de experimentación data del año 1664, pero su utilización como modelo de investigación se lleva utilizando desde hace algo más de un siglo. Su nombre científico es *Mus musculus* y los avances científicos han permitido hacer de éste un modelo para estudiar enfermedades y terapias.

Las características que tradicionalmente se le han atribuido al ratón como modelo biológico son su fácil cuidado y mantenimiento debido a su pequeño tamaño y bajo coste, la posibilidad de usar cepas completamente definidas, su sistema inmune muy parecido al de los humanos, su eficiencia reproductiva y corto tiempo de generación de las crías y por último su corta vida. Entre los inconvenientes que presenta este modelo están las técnicas quirúrgicas para la recolección de material biológico que precisan de personal cualificado, el coste de cada ejemplar o el tiempo necesario para el ensayo.

El uso de un alto número de ratones conlleva una serie de problemas bioéticos. En los últimos años se han establecido normas y protocolos que regulan la experimentación animal que invitan a remplazar siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo, cuando no resulte imprescindible su uso. Si esto no fuera posible, se propone reducir al máximo el número de ellos y refinar los métodos y técnicas para dar un trato correcto a los animales en la experimentación.

(http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf).

En relación al estudio de la patogenicidad de *Staphylococcus*, el uso del ratón como modelo de infección requiere la inoculación de dosis muy altas de *S. aureus* para poder observar la respuesta ante dicha infección (Leitner *et al.*, 2003, Voyich *et al.*, 2005).

3.3.2.- Modelo no mamífero: *Caenorhabditis elegans*

En las últimas décadas, el nematodo *C. elegans* se ha ido poco a poco convirtiendo en un modelo para estudiar la genética del desarrollo, el sistema nervioso, las causas del envejecimiento y la muerte celular y la estructura del genoma. Es el primer organismo pluricelular del que se publicó su genoma y a día de hoy se considera completo (Consortium, 1998). Tiene aproximadamente 2000 genes.

Los motivos que lo hicieron tan popular en el campo de la ciencia es que posee un tamaño milimétrico, su hábitat es el suelo, se alimenta de microorganismos y es capaz de sobrevivir a periodos de ayuno nutritivo.

C. elegans posee un cuerpo cilíndrico y no segmentado. Su forma es de tubo alargado que se adelgaza en los extremos. El cuerpo está recubierto por una fina cutícula exterior. La anatomía es muy simple formando órganos y sistemas. El sistema digestivo está formado por el estoma (boca), la faringe y el intestino. Por otro lado posee las gónadas es decir los órganos sexuales y un sencillo sistema nervioso. No tiene ojos pero es capaz de percibir intensidades luminosas. Es transparente lo que permite visualizar mediante microscopía los diferentes procesos biológicos.

El sistema reproductor de *C. elegans* presenta dos formas sexuales diferentes. El hermafroditismo en el que el nematodo presenta los órganos sexuales de los dos sexos, por lo que tiene oviductos, ovarios y una cavidad donde almacenar el esperma. La otra forma sexual es la masculina. La fecundación, ante la existencia de machos, se da por parte de éstos, los cuales disponen de una cola copulatriz. Ésto permite una mayor variabilidad genética ya que en ausencia de machos los hermafroditas se autofecundan (<http://www.seresmodelicos.csic.es/cuc.html>).

El ciclo vital de *Caenorhabditis elegans* a una temperatura de 25 °C es el siguiente: tras un desarrollo embrionario rápido que dura 15 horas, la larva eclosiona y pasa una serie de fases larvarias (L1 a L4) hasta llegar a adulto en un total de 3 días. Los adultos miden aproximadamente un milímetro de longitud y viven una media de 18-20 días en condiciones de laboratorio (Byerly *et al.*, 1976). Una característica interesante de este nematodo es el hecho de que cuando los nutrientes en el medio escasean o existe una sobrepoblación, entra en diapausa (*dauer*, letargo), es decir un periodo en el cual no se alimenta ni reproduce, pudiendo permanecer en este estado hasta 60 días y reactivarse su ciclo vital una vez las condiciones vuelven a ser favorables (Fig.1).

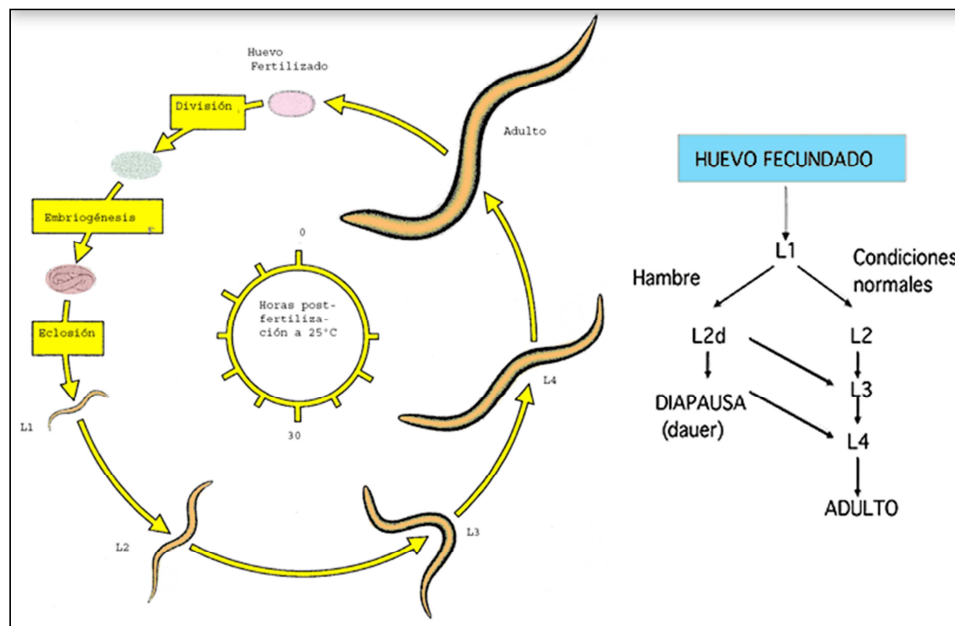


Fig 1. Ciclo de vida de *C. elegans* a 25 °C.

Estudios recientes han demostrado que *C. elegans* es un modelo adecuado para estudiar la interacción entre patógenos microbianos y factores del huésped y para examinar la contribución de genes específicos a la virulencia e inmunidad (Sifri *et al.*, 2005, Kim & Ausubel, 2005). Una característica clave del modelo de patogenicidad en *C. elegans* es que muchos factores de virulencia de bacterias Gram positivas que se han identificado previamente como esenciales en el desarrollo de enfermedad en modelos de mamífero, juegan también un papel importante en el proceso infeccioso en el nematodo (Garsin *et al.*, 2001, Sifri *et al.*, 2003, Sifri *et al.*, 2002, Sifri *et al.*, 2006).

Con respecto a la patogenicidad de *S. aureus*, el nematodo *C. elegans* fue por primera vez usado como modelo para estudiar la virulencia de *S. aureus* por Sifri *et al.* (Sifri *et al.*, 2003). En este estudio se comparó la virulencia de 23 aislados clínicos de *S. aureus* y 5 cepas de laboratorio bien caracterizadas. Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas clínicas (70%) mataron al nematodo con diferentes eficiencias. Por otra parte, la totalidad de las cepas de laboratorio mostraron una alta actividad nematocida. Además, se demostró que la muerte del nematodo se produce a causa de una acumulación de bacterias en el tracto digestivo y que diversos factores de virulencia

implicados en la patogenicidad en mamíferos son también necesarios para la virulencia de *S. aureus* en *C. elegans*.

Profundizando en la citopatología de la infección, Irazoqui et al. demostraron que la acumulación de *S. aureus* en el intestino de *C. elegans* produce una erosión de células epiteliales, seguida de una lisis de dichas células, invasión del resto del cuerpo y la consiguiente degradación de los tejidos del huésped (Irazoqui et al., 2010).

Otro estudio reciente en el que se comparó la virulencia de diferentes aislados de *S. aureus* MRSA ha demostrado de nuevo la utilidad de este modelo en el análisis de la virulencia de esta bacteria (Wu et al., 2010).

Con respecto al proceso de formación de biofilm de *Staphylococcus*, se ha determinado que la mutación del operón *icaADBC* en *S. epidermidis* impide la colonización a largo plazo de *C. elegans*, reduce la acumulación bacteriana y provoca una disminución muy significativa de la capacidad nematocida de esta bacteria. Además, la sobreexpresión del operón *icaADBC* en *S. aureus* da lugar a un aumento de la virulencia (Begun et al., 2007).

4. Material y métodos

4.1.- Cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados

En este trabajo se utilizaron cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* y una de *Escherichia coli*.

-. La cepa *S. aureus* 132 fue aislada de una infección de oído en un paciente de la Clínica Universitaria de Navarra y presenta resistencia a varios antibióticos, entre ellos meticilina. Un estudio previo elaborado en el Laboratorio de Biofilms Microbianos muestra como la composición de la matriz del biofilm que produce este aislado varía según las condiciones ambientales. En un medio rico en nutrientes suplementado con cloruro sódico produce un biofilm de naturaleza polisacáridica, es decir la matriz extracelular está formada por PIA/PNAG, mientras que en este mismo medio suplementado con glucosa produce un biofilm de naturaleza proteica dependiente de proteínas de unión a fibronectina (Vergara-Irigaray et al., 2009). La virulencia de esta cepa es media según resultados no publicados del Laboratorio de Biofilms Microbianos de la Universidad Pública de Navarra (UPNA).

-. La cepa *S. aureus* 132 Δrot posee una mutación en el locus *rot* (repressor of toxins) y ha sido construida en el Laboratorio de Biofilms Microbianos. Rot fue identificado inicialmente como un represor de la actividad proteasa y α -toxina de *S. aureus* (McNamara et al., 2000). Un estudio posterior demostró que Rot es un regulador global de *S. aureus* que reprime la expresión de proteínas secretadas como lipasas, hemolisinas y proteasas, las cuales participan en la invasión de tejidos, y que regula positivamente la expresión de varios genes, entre ellos aquéllos que codifican adhesinas de la superficie celular (Said-Salim et al., 2003).

-. La cepa *S. aureus* 15981 fue aislada en el departamento de Microbiología de la Clínica Universitaria de Navarra y fue seleccionada por su fuerte capacidad de formar biofilm, que depende de la producción de PIA/PNAG (Valle et al., 2003). Esta cepa no es virulenta en ratón según resultados no publicados del Laboratorio de Biofilms Microbianos de la UPNA.

-. La cepa *S. aureus* MW2, resistente a meticilina, se aisló originalmente de un niño de 16 meses de edad de Dakota del Norte que murió de septicemia y artritis séptica en 1998 (1999). Esta cepa ha demostrado ser altamente virulenta en un modelo de

bacteriemia en ratón (Voyich et al., 2005) y no es capaz de formar un biofilm en condiciones de incubación de laboratorio (resultados no publicados del Laboratorio de Biofilms Microbianos de la UPNA).

- La cepa *E. coli* OP50 es la cepa utilizada habitualmente como alimento de *C. elegans*, ya que no es patógena en este modelo de infección y por lo tanto sirve para lograr el crecimiento y desarrollo del nematodo. Presenta resistencia a ampicilina y es auxótrofa para el uracilo. Debido a que el medio NGM utilizado para el crecimiento del nematodo tiene cantidades limitadas de uracilo, *E. coli* OP50 no puede crecer en exceso y así se evita la formación de un césped grueso que impediría la visualización correcta de *C. elegans*.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron los siguientes:

- El medio NGM (Nematode Growth Medium) (Brenner, 1974) se utilizó para crecer y mantener a *C. elegans*. Para su preparación se mezclaron 3g NaCl/L, 2,5g/L bactopectona y 17g/L agar. Tras su esterilización a 121°C durante 50 minutos se suplementó con 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 5 mg/ml colesterol en etanol, 1 ml 1M MgSO₄, 25 ml 1 M KPO₄ y ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

- El medio LB (Luria Bertani; Pronadisa) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml se utilizó para cultivar *E. coli* OP50.

- El medio TSA (Trypticase Soy Agar; Pronadisa) se utilizó para cultivar las cepas de *S. aureus*. Para realizar los ensayos de infección de *C. elegans* por *S. aureus*, este medio se suplementó con ácido nalidíxico a una concentración de 10 µg/ml y se mantuvo en oscuridad a 4°C hasta su uso.

4.2.- Mantenimiento de *C. elegans* y análisis visual de su desarrollo.

La cepa de *C. elegans* utilizada en este trabajo fue la TJ1060, cedida por el Dr. Cabello, Director de la Unidad de Proliferación y Diferenciación Celular del CIBIR (Centro de Investigación Biomédica de La Rioja). Esta es un doble mutante de la cepa N2 en los genes *spe-9* y *fer-15* (Brooks et al., 1994). Estas mutaciones hacen que la cepa sea sensible a la temperatura, que se traduce en su esterilidad a una temperatura mayor a 20°C. Este hecho permite mantener la población del experimento estable durante los ensayos de virulencia evitando que se de una nueva progenie.

La población del nematodo se creció y mantuvo en placas de NGM donde previamente se había sembrado un césped de *E. coli* OP50. Para ello, se realizó un cultivo de *E. coli* OP50 en LB suplementado con ampicilina durante 16h en agitación a 37°C. A partir de este cultivo se sembraron 50 o 100 µL en placas de o bien 3 o 10 cm de diámetro respectivamente, utilizando un asa de siembra acodada, y dichas placas se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente.

Para el mantenimiento del nematodo todos los días se realizó por triplicado un pase de tres adultos con huevos a nuevas placas de NGM con un césped de OP50 y se mantuvieron a 14°C.

La observación del nematodo se realizó con un transiluminador de luz fría y un *estereomicroscopio* binocular *Stemi 2000c* (Zeiss).

Para realizar fotos de los diferentes estadios de desarrollo de *C. elegans* se utilizó un microscopio vertical ~~(Lo miro mañana)~~ *Axioskop 2 plus* (Zeiss) con una cámara acoplada *AxiCamMR3* (Zeiss).

4.3.- Ensayo de supervivencia de *C. elegans* frente a una infección por *S. aureus*

Los ensayos de supervivencia se realizaron según protocolos ya establecidos (Sifri et al., 2003). Las cepas de *S. aureus* se incubaron en TSB suplementado con 10 µg/ml de ácido nalidíxico durante 16 horas a 37°C. 10 µl de este cultivo se sembraron mediante un asa acodada estéril en placas de 3 cm de diámetro conteniendo el medio TSA suplementado con 10 µg/ml de ácido nalidíxico. Las placas se incubaron a 37°C durante 4h y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de ser sembradas con los nematodos. En cada ensayo, se añadieron a cada placa alrededor de 35 nematodos en estadio L4, mediante el uso de una pipeta de vidrio Pasteur con un hilo de platino de 0,25mm de diámetro, que se esterilizó tras cada pase. Las placas se incubaron a 25 °C ya que a esta temperatura el nematodo es estéril, lo que evita que se produzca una nueva progenie durante el ensayo. Cada 12 horas se realizó el recuento del número de *C. elegans* muertos o vivos. Los nematodos se consideraron muertos si no reaccionaron al tocarlos con el asa de platino y a continuación se retiraron de la placa. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Sin Cursiva, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: Cursiva, Color de fuente: Automático, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Cursiva, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: Cursiva, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: Cursiva, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (alfab. internacional)

Para obtener la población necesaria de *C. elegans* en estadio L4 para realizar los ensayos de infección, se traspasaron entre 5 y 8 adultos con huevos a placas de Petri de 3 cm de diámetro, conteniendo el medio NGM suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, en el que previamente se había sembrado un césped de *E. coli* OP50. Las placas se incubaron durante 4 días a 14°C y tras este tiempo se utilizaron para la realización del ensayo.

5. Objetivos

En el presente trabajo fin de master se plantearon los siguientes objetivos:

- Puesta a punto de un método de análisis de la virulencia de *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección en *Caenorhabditis elegans*.
- Diferenciación de la virulencia de cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan diferentes grados en su capacidad de formar un biofilm.

6. Resultados y discusión

6.1.- Puesta a punto del mantenimiento y desarrollo de *C. elegans*

En primer lugar se establecieron las condiciones correctas para la visualización del nematodo con el objetivo de poder establecer las condiciones óptimas de mantenimiento y desarrollo.

La observación del nematodo se realizó usando un estereomicroscopio Stemi-2000c (Zeiss) que permite realizar un zoom continuo desde 6,5x hasta 50x. Las fuentes de luz que se utilizaron fueron frías para así evitar un incremento de temperatura que podría alterar el desarrollo e incluso matar al nematodo. En primer lugar, se utilizaron unas lámparas que proporcionaban una iluminación por encima de las placas, pero los resultados no fueron satisfactorios ya que este tipo de iluminación no permitió la correcta diferenciación del nematodo en el medio de cultivo. En segundo lugar, se procedió a iluminar las placas de cultivo por debajo, utilizando una lámpara con tres bombillas LED. En este caso, la elevada intensidad de luz impidió de nuevo discriminar con claridad los nematodos. Por último se utilizó esta misma lámpara, tapada por un recipiente de plástico semitransparente, lográndose en este caso la observación satisfactoria del nematodo (Fig. 2).

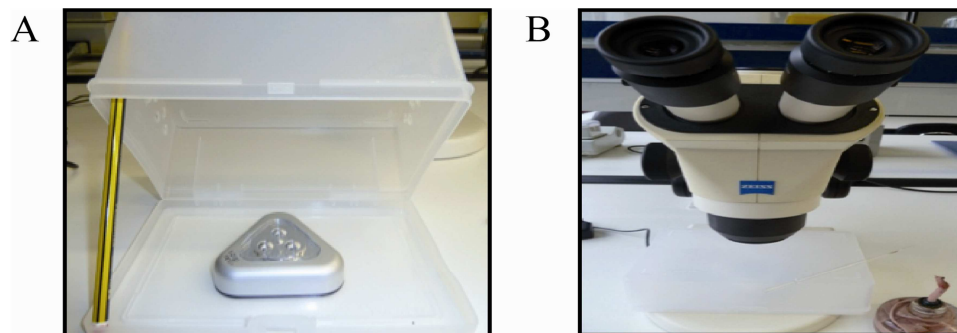


Fig 2. Instrumental utilizado para el estudio del desarrollo del nematodo, el traspaso de *C. elegans* de las placas de mantenimiento a las de infección y la selección de nematodos vivos y muertos durante el ensayo de virulencia. (A) Transiluminador compuesto por una lámpara de 3 LED pegada en la cara interna de la tapa de un recipiente de plástico. (B) Estereomicroscopio junto al transiluminador sobre el que se colocaron las placas de mantenimiento e infección.

Un vez establecidas las condiciones correctas de visualización de *C. elegans*, se procedió a analizar su ciclo de desarrollo a 14 °C, con el objetivo de determinar el tiempo necesario de incubación para alcanzar el estadio L4, puesto que son las larvas en este estadio las utilizadas para los ensayos de infección. Como referencia, se tomaron los datos establecidos por Byerly et al. sobre el desarrollo de *C. elegans* a diferentes temperaturas (Byerly et al., 1976).

Para ello, se procedió a traspasar entre tres y seis adultos con huevos a tres placas de NGM sembradas con la bacteria *E. coli* OP50. Las placas se incubaron a 14°C y se observó el desarrollo de los nematodos cada 12 horas en los siguientes 5 días. Este procedimiento se repitió diariamente durante 6 semanas para poder así comparar placas correspondientes a diferentes tiempos de incubación y garantizar la repetibilidad en los resultados observados.

A continuación se resumen los resultados obtenidos sobre el análisis del ciclo vital de *C. elegans* a 14 °C. A las 12 horas de incubación se observaron los primeros huevos. A las 24 horas la cantidad de huevos era muy alta, y además éstos presentaban diferentes morfologías, correspondientes a diferentes etapas del desarrollo embrionario de *C. elegans* (Fig. 3A). Tal y como se muestra en la figura 3B, a este tiempo de incubación se pudo observar la presencia simultánea de adultos (0,8mm y 30µm Ø), huevos y alguna larva en estadio L1. Tras 36 horas de incubación se observó un gran número de larvas en estadio L1 y tras 60 horas se comprobó la presencia de larvas en estadio L2, cuya longitud es aproximadamente 5 veces mayor a la de un huevo (Fig. 3C). A las 72 horas de incubación se observaron larvas en estadio L3 cuyo tamaño es ligeramente inferior a las larvas en estadio L4, con un desarrollo incompleto de la vulva y a las 96 horas se observaron las primeras larvas en estadio L4, que se pueden identificar fácilmente por la presencia de la vulva en forma de media luna, aproximadamente en la parte central del nematodo y por un tamaño y diámetro superior al del estadio L3 (Fig. 3D).

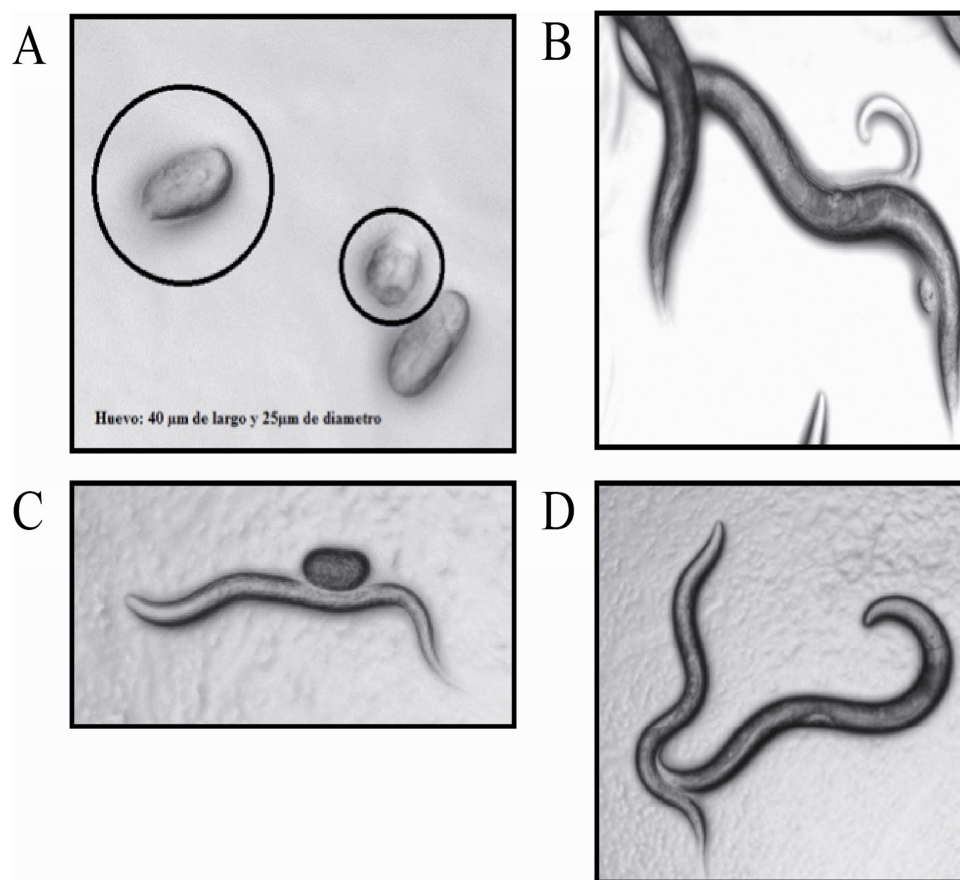


Fig 3. Imágenes de los diferentes estadios de desarrollo de *Caenorhabditis elegans*. (A) Huevos en diferentes etapas de desarrollo embrionario. (B) Dos adultos, un huevo al lado de la parte inferior de un adulto y una larva en estadio L1 por encima de este adulto. (C) Larva en estadio L2 junto a un huevo. (D) Larva en estadio L3 (izda.) y L4 (dcha.).

6.2.- Ensayos de infección de *C. elegans* con cepas de *S. aureus* que poseen diferente capacidad de formar biofilm y virulencia

Para realizar los ensayos de infección con las diferentes cepas de *S. aureus* se utilizó el protocolo descrito en la sección “Ensayo de supervivencia de *C. elegans* frente a una infección por *S. aureus*” de Material y Métodos. El medio TSA utilizado para estos ensayos se suplementó con ácido nalidíxico 10 μg/ml con el objetivo de evitar el crecimiento de *E. coli* OP50 que accede a estas placas durante el traspaso de larvas en

estadio L4 desde las placas de NGM. Si no existiese esta inhibición, *C. elegans* podría seguir alimentándose de *E. coli* OP50 en vez de las distintas cepas de *S. aureus* objeto de estudio.

6.2.1.- Infección de *C. elegans* con las cepas *S. aureus* 132 y 15981

En un estudio anterior realizado en el laboratorio dirigido por el Dr. Irazoqui del Department of Pediatrics, Massachusetts General Hospital, Boston, en el que se analizó la virulencia de la cepa *S. aureus* 15981, fuertemente formadora de biofilm dependiente de PIA/PNAG, se comprobó que esta cepa presentaba una alta actividad nematocida, ya que se producía la muerte de más del 50% de la población entre el segundo y tercer día de incubación (Sifri et al., 2003). Por ello, en primer lugar y para poner a punto el modelo de infección de *C. elegans* se realizó el ensayo con esta misma cepa, esperando obtener resultados similares a los descritos.

Además, de forma simultánea se analizó la virulencia de la cepa *S. aureus* 132 que es capaz de formar un biofilm de diferente naturaleza según las condiciones ambientales. En un medio rico en nutrientes suplementado con cloruro sódico produce un biofilm de naturaleza polisacárida, es decir la matriz extracelular está formada por PIA/PNAG, mientras que en este mismo medio suplementado con glucosa produce un biofilm de naturaleza proteica dependiente de proteínas de unión a fibronectina (Vergara-Irigaray et al., 2009).

Las cepas 15981 y 132 presentan una virulencia baja y media respectivamente en un modelo de bacteriemia en ratón (resultados no publicados del Laboratorio de Biofilms Microbianos). Debido a que el ratón es un modelo muy resistente a la infección por *S. aureus* y en el que por lo tanto generalmente se necesitan altas dosis para lograr una infección, el modelo de infección en *C. elegans* podría ser un modelo alternativo que discriminase con una mayor selectividad la virulencia de diferentes cepas de *S. aureus*.

En este primer ensayo se realizó el recuento de nematodos muertos cada 12 horas y la población superviviente se calculó restando este número al total de nematodos colocados inicialmente en la placa. Cada ensayo se realizó en tres placas de infección para así analizar una población total de aproximadamente 100 nematodos y además se realizó por duplicado, comenzando la infección en días diferentes.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo con la cepa *S. aureus* 15981 muestran que el proceso de virulencia fue sustancialmente más lento y en menor grado que los resultados obtenidos previamente, ya que tras seis días y medio de incubación sólo se alcanzó un 15% de mortalidad. Además, las curvas de supervivencia de las cepas 15981 y 132 resultaron ser muy similares, obteniéndose en ambos casos una población superviviente de más del 85% tras seis días de incubación.

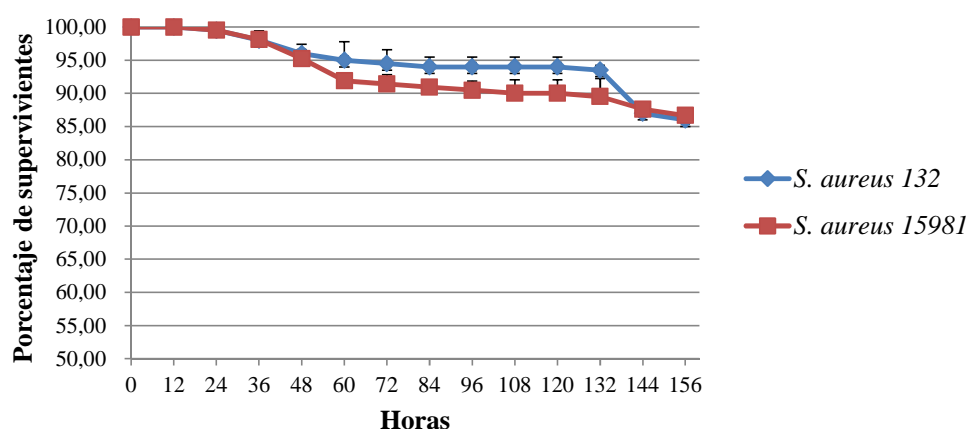


Fig. 4. Análisis de la virulencia de *S. aureus* 15981 y 132. Los datos de supervivencia representan las medias de tres réplicas de dos experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Estos experimentos se repitieron en otras dos ocasiones para comprobar la fiabilidad de los datos obtenidos. Los resultados mostraron de nuevo la escasa virulencia de ambas cepas en este modelo y confirmaron los resultados obtenidos en el primer ensayo (Fig. 5 y 6).

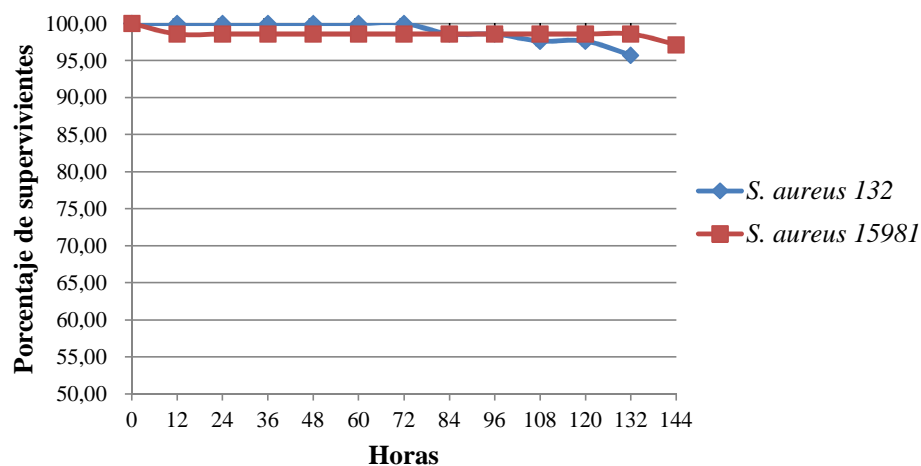


Fig. 5. Segundo análisis de la virulencia de *S. aureus* 15981 y 132. Los datos de supervivencia representan las medias de tres réplicas de dos experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

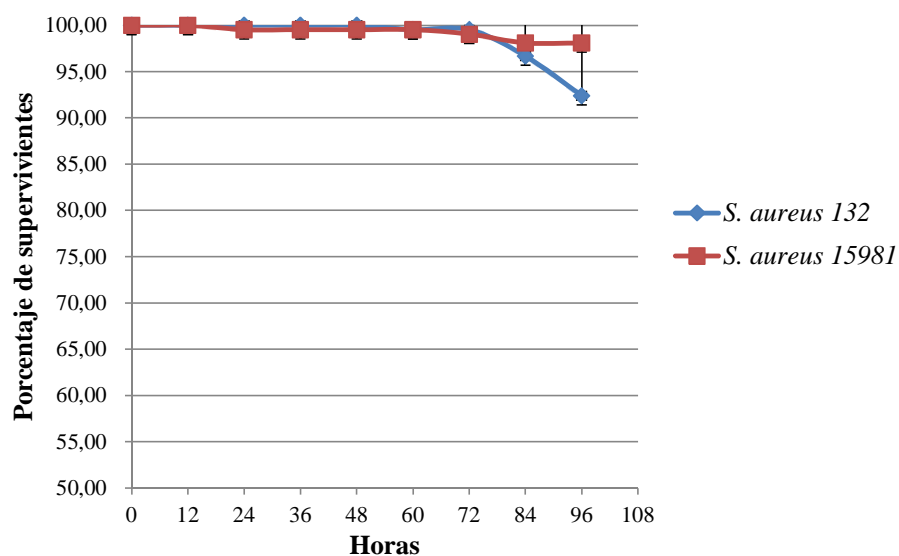


Fig. 6. Tercer análisis de la virulencia de *S. aureus* 15981 y 132. Los datos de supervivencia representan las medias de tres réplicas de dos experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

El hecho de que, en todos los casos, se contara un número muy escaso de nematodos muertos sugería que el método de visualización empleado no nos estuviese permitiendo identificarlos bien, y que por lo tanto se estuviese subestimando dicha población. Para comprobar esta hipótesis se realizó un experimento de infección por triplicado de *C. elegans* con las cepas *S. aureus* 132 y 15981 y se contabilizaron tanto los nematodos vivos como muertos tras 4 días de incubación (Fig. 7.), que deberían haber sumado el total de los nematodos colocados en cada placa inicialmente (35 aproximadamente). Sin embargo, el recuento total fue en todos los casos muy inferior al esperado, confirmando que el recuento de nematodos muertos no es un método fiable bajo nuestras condiciones de visualización. Por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron contabilizando los nematodos vivos a lo largo de la infección por *S. aureus*.

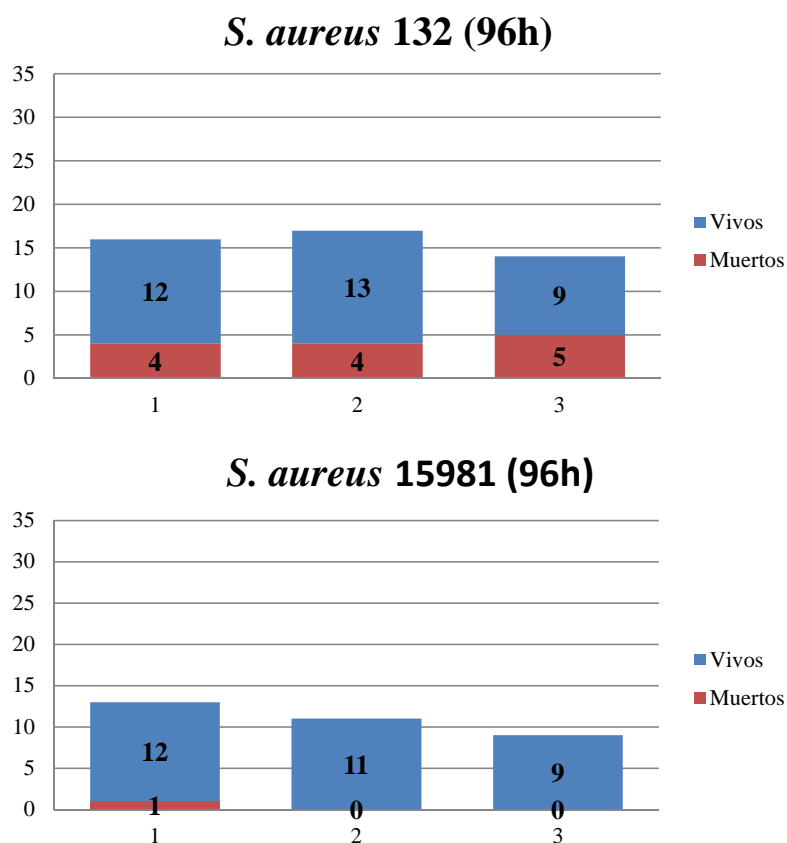


Fig. 7. Recuento de *C. elegans* vivos y muertos a las 96 horas tras la infección con las cepas de *S. aureus* 132 y 15981.

6.2.2.- Comparación de la virulencia de la cepa *S. aureus* 132 y la del aislado clínico *S. aureus* MW2.

La cepa *S. aureus* MW2 no es formadora de biofilm en condiciones de laboratorio y es muy virulenta en ratón. En el artículo publicado por Voyich et al. (Voyich et al., 2005) encontraron que tras un ensayo de bacteriemia en ratón infectado con 10^8 UFC de *S. aureus* MW2, se produce una colonización en prácticamente todos los órganos vitales destacando el hígado, pulmón, riñón e incluso cerebro, produciendo la muerte del huésped. Por ello, se seleccionó esta cepa para analizar su virulencia en el modelo de infección en *C. elegans*, esperando obtener una tasa de infección mayor a la obtenida con las dos cepas anteriores. Por lo tanto, este ensayo se basó en la comparación de la virulencia de la cepa *S. aureus* 132 y la de *S. aureus* MW2.

En primer lugar cabe destacar que el recuento de nematodos vivos dio lugar a una tasa de mortalidad mayor comparada con la tasa obtenida en los ensayos anteriores al contar erróneamente nematodos muertos. Sin embargo, el recuento de *C. elegans* vivos presentó problemas a partir de las 96 horas de infección, ya que el crecimiento de *S. aureus* en la placa impidió la correcta visualización de los nematodos. Como se puede observar en la figura 8, a las 96 horas tras la infección, la cepa *S. aureus* 132 logró matar a un 35% de los nematodos aproximadamente. Por otra parte y al contrario de lo esperado, los resultados mostraron una tasa de mortalidad del nematodo similar tras ser infectado con la cepa *S. aureus* MW2 y por lo tanto el ensayo de infección en *C. elegans* no reprodujo los resultados mencionados anteriormente, obtenidos en el modelo de ratón.

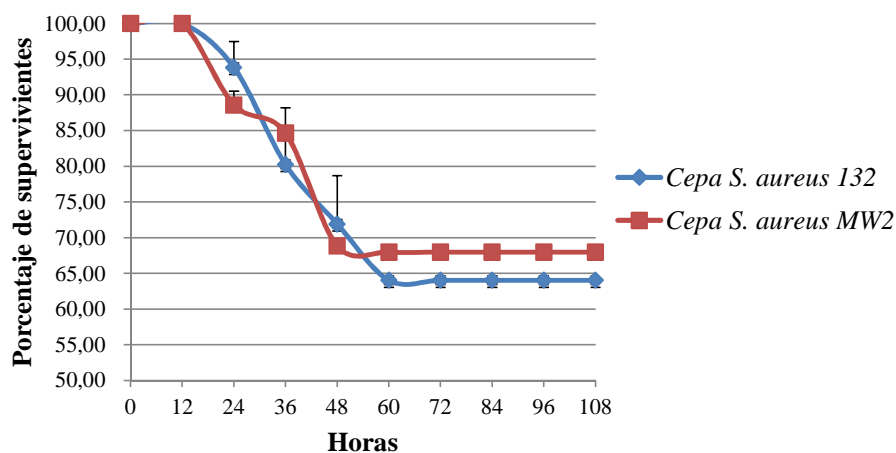


Fig. 8. Análisis de la virulencia de *S. aureus* 132 y MW2. Los datos de supervivencia representan las medias de tres réplicas de dos experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

6.2.3.- Análisis de la virulencia de un mutante en *rot*.

La cepa *S. aureus* 132 Δ rot tiene una mutación en el locus *rot* que es un regulador global que reprime la expresión de proteínas secretadas, algunas de las cuales han sido identificadas como factores de virulencia. Por lo tanto, este mutante se utilizó para analizar si el nematodo se veía afectado ante la infección con una cepa que presenta una alta producción de toxinas. La virulencia de este mutante se comparó con la de su cepa parental, *S. aureus* 132.

Los resultados fueron de nuevo inesperados, ya que la cepa mutante en *rot* no presentó una virulencia significativamente mayor a la de su cepa parental y por lo tanto no se pudo establecer una relación entre la alta producción de toxinas y una mayor virulencia en el modelo de infección de *C. elegans*.

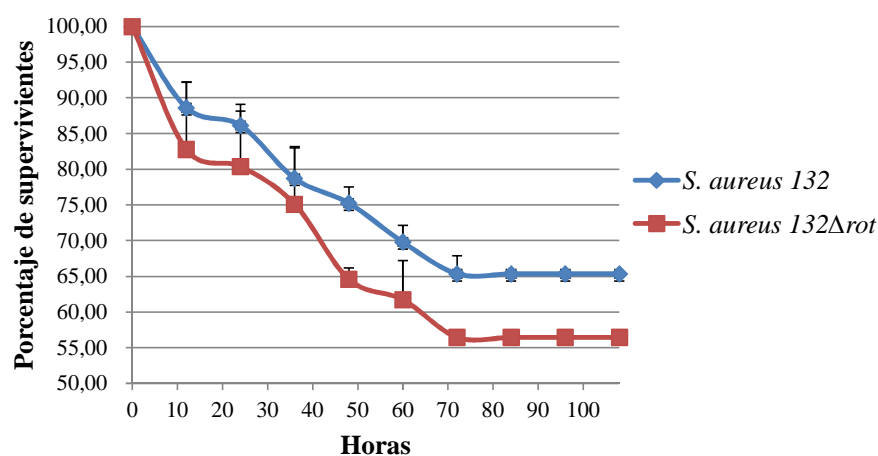


Fig. 9. Análisis de la virulencia de *S. aureus* 132 y 132 Δrot. Los datos de supervivencia representan las medias de tres réplicas de dos experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Los resultados de todos los análisis aquí mostrados indican que el modelo de infección que se ha establecido en el laboratorio de *C. elegans* por *S. aureus* no es capaz de discriminar entre la virulencia de diferentes cepas de *S. aureus* y por lo tanto se podría pensar en modelos alternativos que presenten ventajas similares a *C. elegans*. Uno de ellos es el insecto *Galleria mellonella* que permite el desarrollo del ensayo a 37°C, temperatura a la que se produce la infección en mamíferos y la infección del modelo puede llevarse a cabo por inyección o a través de una aplicación tópica que hacen fácil su manejo (Jander *et al.*, 2000). Existen estudios que consideran a este nuevo modelo biológico como adecuado para el análisis de la virulencia en *S. aureus* (Peleg *et al.*, 2009).

7. Conclusiones

- Se ha puesto a punto el ciclo de crecimiento de *C. elegans* en el laboratorio.
- Se ha puesto a punto el proceso de infección de *C. elegans* por *S. aureus*.
- El modelo de infección de *C. elegans* establecido no permite diferenciar la virulencia de cepas que presentan diferente capacidad de formar un biofilm y grado de virulencia en un modelo de infección en ratón.
- El recuento de nematodos durante el ensayo a partir de las 96 horas dificulta el recuento de gusanos vivos debido al enorme desarrollo del césped formado por *S. aureus*.

8. Bibliografia

- (1999) Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **48**: 707-710.
- Arciola, C. R., L. Baldassarri & L. Montanaro, (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-2156.
- Argudin, M. A., M. C. Mendoza & M. R. Rodicio, (2010) Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins (Basel)* **2**: 1751-1773.
- Baltimore, R. S. & M. Mitchell, (1980) Immunologic investigations of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. *J Infect Dis* **141**: 238-247.
- Bancroft, E. A., (2007) Antimicrobial resistance: it's not just for hospitals. *JAMA* **298**: 1803-1804.
- Beenken, K. E., P. M. Dunman, F. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, J. S. Blevins & M. S. Smeltzer, (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 4665-4684.
- Begun, J., J. M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel & C. D. Sifri, (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* **3**: e57.
- Brenner, S., (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Brooks, A., G. J. Lithgow & T. E. Johnson, (1994) Mortality rates in a genetically heterogeneous population of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **263**: 668-671.
- Byerly, L., R. C. Cassada & R. L. Russell, (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* **51**: 23-33.
- Consortium, C. e. S., (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart & E. P. Greenberg, (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols & F. Gotz, (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa & J. R. Penades, (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa & J. R. Penades, (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**: 2177-2185.
- Christensen, G. D., L. M. Baddour & W. A. Simpson, (1987) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infect Immun* **55**: 2870-2877.
- Donlan, R. M. & J. W. Costerton, (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Drapeau, G. R., Y. Boily & J. Houmard, (1972) Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **247**: 6720-6726.
- Fitzpatrick, F., H. Humphreys & J. P. O'Gara, (2005) Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **43**: 1973-1976.
- Flemming, H. C., T. R. Neu & D. J. Wozniak, (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**: 7945-7947.

- Flemming, H. C. & J. Wingender, (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623-633.
- Foster, T. J., (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 948-958.
- Fowler, V. G., Jr., P. D. Fey, L. B. Reller, A. L. Chamis, G. R. Corey & M. E. Rupp, (2001) The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* **189**: 127-131.
- Francolini, I. & G. Donelli, (2010) Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**: 227-238.
- Frank, K. L., A. D. Hanssen & R. Patel, (2004) *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* **42**: 4846-4849.
- Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood & F. M. Ausubel, (2001) A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10892-10897.
- Gordon, R. J. & F. D. Lowy, (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**: S350-359.
- Gotz, F., (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.
- Gristina, A. G., R. A. Jennings, P. T. Naylor, Q. N. Myrvik & L. X. Webb, (1989) Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 813-816.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack & F. Gotz, (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Irazoqui, J. E., E. R. Troemel, R. L. Feinbaum, L. G. Luhachack, B. O. Cezairliyan & F. M. Ausubel, (2010) Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog* **6**: e1000982.
- Jander, G., L. G. Rahme & F. M. Ausubel, (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**: 3843-3845.
- Jefferson, K. K., (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* **236**: 163-173.
- Jefferson, K. K., D. B. Pier, D. A. Goldmann & G. B. Pier, (2004) The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**: 2449-2456.
- Kharazmi, A., B. Giwercman & N. Hoiby, (1999) Robbins device in biofilm research. *Methods Enzymol* **310**: 207-215.
- Kim, D. H. & F. M. Ausubel, (2005) Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* **17**: 4-10.
- Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey & S. K. Fridkin, (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* **298**: 1763-1771.
- Kuroda, M., R. Ito, Y. Tanaka, M. Yao, K. Matoba, S. Saito, I. Tanaka & T. Ohta, (2008) *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **377**: 1102-1106.
- Leitner, G., O. Krifucks, A. Glickman, A. Younis & A. Saran, (2003) *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 99-106.
- Lewis, K., (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 999-1007.
- Lim, Y., M. Jana, T. T. Luong & C. Y. Lee, (2004) Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**: 722-729.
- Loo, C. Y., M. Wilson & D. Devine, (2003) *Oral Streptococcal Genes That Encode Biofilm Formation*

Medical Implications of Biofilms. Cambridge University Press.

- Lopez Furst, M. J., (2011) [Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the emergency of a pathogen]. *Medicina (B Aires)* **71**: 585-586.
- Maira-Litran, T., A. Kropec, C. Abeygunawardana, J. Joyce, G. Mark, 3rd, D. A. Goldmann & G. B. Pier, (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.
- McKenney, D., K. L. Pouliot, Y. Wang, V. Murthy, M. Ulrich, G. Doring, J. C. Lee, D. A. Goldmann & G. B. Pier, (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* **284**: 1523-1527.
- McNamara, P. J., K. C. Milligan-Monroe, S. Khalili & R. A. Proctor, (2000) Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 3197-3203.
- Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J. A. Lopez, T. J. Foster, J. R. Penades & I. Lasa, (2009) Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**: 832-843.
- O'Gara, J. P. & H. Humphreys, (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* **50**: 582-587.
- O'Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, H. Humphreys, D. A. Robinson, A. Loughman, T. J. Foster & J. P. O'Gara, (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* **190**: 3835-3850.
- Peleg, A. Y., D. A. Hogan & E. Mylonakis, (2010) Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* **8**: 340-349.
- Peleg, A. Y., D. Monga, S. Pillai, E. Mylonakis, R. C. Moellering, Jr. & G. M. Eliopoulos, (2009) Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* **199**: 532-536.
- Roche, F. M., M. Meehan & T. J. Foster, (2003) The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* **149**: 2759-2767.
- Rohde, H., M. Kalitzky, N. Kroger, S. Scherpe, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, A. R. Zander & D. Mack, (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.
- Romero, D. & R. Kolter, (2011) Will biofilm disassembly agents make it to market? *Trends Microbiol* **19**: 304-306.
- Said-Salim, B., P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan & B. N. Kreiswirth, (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**: 610-619.
- Shanks, R. M., N. P. Donegan, M. L. Graber, S. E. Buckingham, M. E. Zegans, A. L. Cheung & G. A. O'Toole, (2005) Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* **73**: 4596-4606.
- Shanks, R. M., M. A. Meehl, K. M. Brothers, R. M. Martinez, N. P. Donegan, M. L. Graber, A. L. Cheung & G. A. O'Toole, (2008) Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway in *Staphylococcus aureus* that is dependent on fibronectin binding proteins and the GraRS two-component regulatory system. *Infect Immun* **76**: 2469-2477.
- Shapiro, J. A., (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**: 81-104.
- Sifri, C. D., A. Baresch-Bernal, S. B. Calderwood & C. von Eiff, (2006) Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun* **74**: 1091-1096.
- Sifri, C. D., J. Begun & F. M. Ausubel, (2005) The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* **13**: 119-127.

- Sifri, C. D., J. Begun, F. M. Ausubel & S. B. Calderwood, (2003) *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* **71**: 2208-2217.
- Sifri, C. D., E. Mylonakis, K. V. Singh, X. Qin, D. A. Garsin, B. E. Murray, F. M. Ausubel & S. B. Calderwood, (2002) Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun* **70**: 5647-5650.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann & K. H. Krause, (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol* **1**: 101-117.
- Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles & A. J. Szalai, (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 4720-4724.
- Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades & I. Lasa, (2003) SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48**: 1075-1087.
- Vergara-Irigaray, M., J. Valle, N. Merino, C. Latasa, B. Garcia, I. Ruiz de Los Mozos, C. Solano, A. Toledo-Arana, J. R. Penades & I. Lasa, (2009) Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun* **77**: 3978-3991.
- Voyich, J. M., K. R. Braughton, D. E. Sturdevant, A. R. Whitney, B. Said-Salim, S. F. Porcella, R. D. Long, D. W. Dorward, D. J. Gardner, B. N. Kreiswirth, J. M. Musser & F. R. DeLeo, (2005) Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* **175**: 3907-3919.
- Webb, J. S., M. Givskov & S. Kjelleberg, (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol* **6**: 578-585.
- Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh & J. L. Nouwen, (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.
- Wu, J. A., C. Kusuma, J. J. Mond & J. F. Kokai-Kun, (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 3407-3414.
- Wu, K., J. Conly, J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie & K. Zhang, (2010) *Caenorhabditis elegans* as a host model for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **16**: 245-254.
- Yarwood, J. M., D. J. Bartels, E. M. Volper & E. P. Greenberg, (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology* **186**: 1838-1850.
- Zimmerli, W., A. Trampuz & P. E. Ochsner, (2004) Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* **351**: 1645-1654.